

Wstępna analiza przydatności badania immunohistochemicznego bioptatu nerki i skóry w wykrywaniu chorób kolagenu typu IV

Zespół Alporta (ZA) – postać choroby kolagenu typu IV - jest genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem struktur błon podstawnych, charakteryzującym się dziedziczną, postępującą glomerulopatią i upośledzeniem słuchu oraz objawami ze strony narządu wzroku. Przyczyną choroby jest brak lub mutacja jednego lub dwóch genów kodujących łańcuchy α kolagenu typu IV. Zidentyfikowano 6 różnych genetycznie łańcuchów α kolagenu IV: $\alpha 1$ - $\alpha 6$ kodowanych genami COL4A1 do COL4A6. Łańcuchy $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ mają wysoką ekspresję w błonie podstawnej kłębuszka, torebce Bowmana i cewce dalszej nefronu, błonie podstawnej przedniej torebki soczewki, błonie Descementa i błonie Bruchsa w narządzie wzroku oraz ślimaka w narządzie słuchu. W nabłonku skóry oprócz łańcuchów $\alpha 1$ i $\alpha 2$ występują łańcuchy $\alpha 5$ i $\alpha 6$ kolagenu IV.

Badaniem immunohistochemicznym za pomocą swoistych monoklonalnych przeciwciał można wykryć obecnie każdy łańcuch α kolagenu IV. Ekspresja łańcuchów α w prawidłowej nerce i w ZA jest różna w poszczególnych segmentach nefronu.

Biopsja skóry ma znaczenie diagnostyczne, ponieważ u zdrowych osób ekspresja łańcucha $\alpha 5$ jest podobna zarówno w błonie podstawnej nabłonka skóry, jak i kłębuszka nerkowego. Nieobecność łańcucha $\alpha 5$ w błonie podstawnej nabłonka jest cechą znamionową dla postaci ZA związanej z chromosomem X.

Celem pracy było wdrożenie diagnostyki chorób kolagenu typu IV opartej na badaniu immunohistochemicznym bioptatu nerki i skóry oraz analiza przydatności tego badania w wykrywaniu chorób kolagenu typu IV.

Materiał i metody: Do badania zostało zakwalifikowanych 46 pacjentów (24 dziewczynki i 22 chłopców w wieku od 2 do 18 lat), u których podejrzewano zespół Alporta. Oceniono materiał z 16 gruboigłowych biopsji nerki oraz 35 biopsji skóry. Łącznie wykonano 51 oznaczeń (badań immunohistochemicznych z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych).

Wyniki: Rozpoznanie zespołu Alporta potwierdzono u 39 pacjentów (19 dziewczynek i 20 chłopców). U 5 dziewczynek (20,83% badanych dziewczynek) i 2 chłopców (9,1% badanych chłopców) stwierdzono prawidłową dystrybucję kolagenu typu IV, co nie zaprzecza rozpoznaniu choroby kolagenu typu IV. U pacjentów spokrewnionych (6 rodzin) stwierdzono identyczną dystrybucję łańcuchów α kolagenu IV w badanych tkankach, w poszczególnych rodzinach.

Wnioski: 1. Badanie immunohistochemiczne za pomocą swoistych monoklonalnych przeciwciał pozwalające wykryć poszczególne łańcuchy α kolagenu IV w błonach podstawnych nerki, a także w błonie podstawnej nabłonka skóry jest pomocne w potwierdzeniu zespołu Alporta.

2. Biopsja skóry jest prostym, nieinwazyjnym badaniem pozwalającym uniknąć u pacjentów z podejrzeniem zespołu Alporta i nieznacznie nasilonymi objawami klinicznymi wykonania biopsji nerki.

(NEFROL. DIAL. POL. 2013, 17, 140-144)

Preliminary analysis of usefulness of immunohistochemical evaluation of renal and dermal biopsy specimen in diagnosing of collagen IV –related diseases

Alport syndrome is genetically determined structural defect of glomerular basement membrane, with progressive renal dysfunction, hearing loss and visual disturbances. Mutation of specific genes coding α -chain of collagen type IV is underlying mechanism. Overall 6 different chains are identified: $\alpha 1$ - $\alpha 6$, coded by COL4A1 –COL4A6 genes. Chains $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ show high expression in glomerular basement membrane, Bowman capsule, distal tubule, anterior basement membrane of lens capsule, Descement and Bruch's membranes in the eye and in cochlea. Chains $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ are present in dermal epithelium. Currently available monoclonal immunohistochemical technique detects presence of each chain of collagen IV, however expression of chains in healthy kidneys and renal tissue in Alport syndrome is different in particular segments of nephron. Dermal

Katarzyna GADOMSKA-PROKOP¹
Przemysław KLUGE²
Agnieszka PERKOWSKA-PTASIŃSKA³
Sylwester PROKURAT¹
Ryszard GRENDA¹

¹Klinika Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IP CZD, Warszawa

²Zakład Patologii IP CZD, Warszawa

³Klinika Medycyny Transplantacyjnej i Nefrologii, Instytutu Transplantologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Słowa kluczowe:

- zespół Alporta
- kolagen typu IV
- dziedziczna nefropatia
- biopsja skóry

Key words:

- Alport syndrome
- type IV collagen
- hereditary nephropathy
- skin biopsy

Adres do korespondencji:
Lek.med. Katarzyna Gadomska-Prokop
Klinika Nefrologii, Transplantacji Nerek
i Nadciśnienia Tętniczego IP CZD, Warszawa
E-mail: k.gadomska@czd.pl
Tel: 22 8151540
Fax: 22 8151541

biopsy has diagnostic value, as in healthy individuals expression of $\alpha 5$ chain in dermal and renal basement membrane is similar, while in chromosome X-linked Alport syndrome dermal $\alpha 5$ chain is lacking.

Aim of the study was introducing the technique of evaluation of collagen IV-related diseases, based in immunohistochemical testing of renal and dermal biopsy specimens and analysis of it's diagnostic value.

Patients and methods: Overall 46 patients (24 females and 22 males) in age from 2 to 18 years were diagnosed for Alport syndrome. Overall 16 renal biopsies and 35 dermal biopsies were performed and 51 immunohistochemical tests with use of monoclonal abs were done.

Results: Diagnosis of Alport syndrome was confirmed in 39 patients (19 girls and 20 boys). In 5 girls (20,83% of all female patients) and in 2 boys (9,1% of all male patients) normal distribution of type IV collagen was confirmed. In relative patients (6 families) identical distribution of chains was confirmed in relevant families.

Conclusion:

1. Dermal and renal monoclonal testing for collagen IV α chains is useful diagnostic tool in Alport syndrome
2. Dermal biopsy is simple, low-invasive test, which may substitute renal biopsy in mild cases

Comment – this was preliminary study and will be continued

(NEPROL. DIAL. POL. 2013, 17, 140-144)

Zespół Alporta (ZA) – postać choroby kolagenu typu IV - jest genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem struktur błon podstawnych, charakteryzującym się dziedziczną, postępującą glomerulopatią i upośledzeniem słuchu oraz objawami ze strony narządu wzroku. Występuje z częstością od 1:5000 do 1:10000 populacji i stanowi przyczynę 0,6-2,3% przypadków schyłkowej niewydolności nerek w krajach Europy Zachodniej i USA.

Przyczyną choroby jest brak lub mutacja jednego lub dwóch genów kodujących łańcuchy α kolagenu typu IV. Siatka kolagenu IV złożona z łańcuchów α jest główną składową błony podstawnej kłębuszków. Na skutek mutacji powstają nieprawidłowe łańcuchy α . Siatka kolagenu nie może być w tej sytuacji utworzona lub jest niestabilna, dochodzi do zmian w budowie, czynności oraz właściwościach antygenowych błony podstawnej kłębuszków [2,14].

Zidentyfikowano 6 różnych genetycznie łańcuchów α kolagenu IV: $\alpha 1$ - $\alpha 6$ kodowanych genami COL4A1 do COL4A6, ułożonymi parami na 3 różnych chromosomach:

- COL4A1 i COL4A2 na długim ramieniu chromosomu 13
- COL4A3 i COL4A4 na chromosomie 2
- COL4A5 i COL4A6 na długim ramieniu chromosomu X [6,11].

Łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ kolagenu IV obecne są w błonach podstawnych wszystkich komórek ustroju oraz w mezangium kłębuszka nerkowego, a duże mutacje w genach COL4A1 i COL4A2 są letalne w okresie embrionalnym. Łańcuchy $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ mają wysoką ekspresję w błonie podstawnej kłębuszka, torebki Bowmana i cewce dalszej nefronu, błonie podstawnej przedniej torebki soczewki, błonie Descementa i błonie Bruchsa w narządzie wzroku oraz ślimaka w narządzie słuchu. W nabłonku

skóry oprócz łańcuchów $\alpha 1$ i $\alpha 2$ występują łańcuchy $\alpha 5$ i $\alpha 6$ kolagenu IV [2].

W zależności od lokalizacji defektu genetycznego, w dużej grupie „chorób kolagenu typu IV” wyróżnia się postacie choroby (Tab. I) różniące się sposobem dziedziczenia i przebiegiem klinicznym.

Coraz częściej podkreślana jest rola zaburzeń w genach COL4A3 i COL4A4 w patogenezie rodzinnego łagodnego krwinkomoczu. U około połowy chorych w mikroskopie elektronowym stwierdza się regularne ścięczenie blaszki gęstej błony podstawnej kłębuszka podobnej do zmian stwierdzanych we wczesnej fazie ZA. Wsunięto hipotezę, że pacjenci z „cienkimi błonami” są faktycznie heterozygotami postaci recesywnej lub dziedziczonej dominująco ZA [3,7,10,12].

Ze względu na zagrożenie niewydolnością nerek oraz fakt, iż określone warianty choroby stanowią czynnik ryzyka rozwoju glomerulopatii *de novo* po transplantacji nerki, spowodowanej produkcją przeciwciał przeciwko łańcuchom kolagenu IV w przeszczepionej nerce – dokładne ustalenie rozpoznania ma podstawowe znaczenie kliniczne.

W mikroskopie świetlnym zmiany pojawiają się po 5r.ż. i nie są charakterystyczne. Stwierdza się ogniskowy lub rozlany rozplam komórek lub przybytek macierzy mezangium. W okresie pogarszania się czynności nerek widoczne jest włóknienie i postępująca ekspansja tkanki śródmiąższowej, znaczne pogrubienie, a często również podwójne okonturowanie ścian kapilarów kłębuszków i ogniskowe szkliwienie kłębuszków, zanik cewek i pogrubienie ich błon podstawnych. U 40% chorych występują komórki piankowate. Nie stwierdza się obecności złożeń immunoglobulin ani składo-

wych układu dopełniacza. Patognomoniczny dla ZA jest wyłącznie obraz w mikroskopie elektronowym. Charakterystyczne zmiany stwierdane są w obrazie błony podstawnej, która wykazuje zmienną grubość (100-1200 nm). U dzieci dominuje segmentalne ścięczenie, a u dorosłych rozlane pogrubienie i rozszczepienie błony podstawnej. Blaszka gęsta jest rozwarstwiona i pogrubiała, tworzy heterogenną siatkę z przejrzystymi obszarami, które często zawierają kuliste, elektronowo gęste ziarnistości o średnicy 20-90 nm. W odcinkach z najbardziej nasilonymi zmianami wyrostki stopowate podocytów są zniekształcone, nawet w nieobecności białkomoczu [2,5,7,14].

„Złotym standardem” w rozpoznawaniu ZA jest badanie genetyczne z oznaczeniem określonych mutacji genowych w odpowiednich eksonach chromosomów X, 2 i 13 prowadzących do zaburzeń struktury kolagenu IV [2].

Badaniem immunohistochemicznym za pomocą swoistych monoklonalnych przeciwciał można wykryć obecnie każdy łańcuch α kolagenu IV. Ekspresja łańcuchów α w prawidłowej nerce i w ZA jest różna w poszczególnych segmentach nefronu. Analiza porównawcza typowej dystrybucji łańcuchów α kolagenu IV w błonach podstawnych nerki u zdrowych i chorych z chorobą kolagenu typu IV ułatwia postawienie prawidłowego rozpoznania postaci ZA. W błonie podstawnej kłębuszka, cewki dalszej i torebki Bowmana, u chłopców w postaci sprężonej z płcią, zwykle brak ekspresji łańcuchów $\alpha 5$, ale występuje także brak lub zmniejszenie ekspresji łańcuchów $\alpha 3$ i $\alpha 4$, co jest specyficznym markerem dla ZA. W postaci recesywnej nie stwierdza się łańcuchów $\alpha 3$ i $\alpha 4$ w błonie podstawnej kłębuszka, cewki dalszej i torebki Bowmana, brak łańcucha $\alpha 5$ w błonie podstawnej

Tabela I

Defekty genetyczne i ich lokalizacja w poszczególnych postaciach ZA wg Wyszyńskiej.
Genetic defects and their localization in specific forms of Alport syndrome.

Sposób dziedziczenia	Odpowiedzialny gen (geny)	Lokalizacja	Defektywny łańcuch α kolagenu typu IV	% przypadków ZA
Dominujący związany z płcią (XLD)	COL4A5	Xq22-25	$\alpha 5$	~ 85%
XLD z lejmatozą	COL4A5 COL4A6		$\alpha 5$ i $\alpha 6$	< 0,1%
Autosomalny recesywny (AR)	COL4A3 lub COL4A4	2q35-37	$\alpha 3$ lub $\alpha 4$	~14%
Autosomalny dominujący (AD)	COL4A3 COL4A4	2q35-37	$\alpha 3$ i $\alpha 4$	~1%

kłębuszka, natomiast wyrażona jest jego ekspresja w cewce zbiorczej i torebce Bowmana [4,5,7,9].

Podobne znaczenie diagnostyczne ma biopsja skóry, ponieważ u zdrowych osób ekspresja łańcucha $\alpha 5$ jest podobna zarówno w błonie podstawnej nabłonka skóry, jak i kłębuszka nerkowego. Nieobecność łańcucha $\alpha 5$ w błonie podstawnej nabłonka jest cechą zmienną dla postaci ZA związanej z chromosomem X. U heterozygot ekspresja łańcucha $\alpha 5$ jest mozaikowata, a jej stopień koreluje odwrotnie z nasileniem białkomoczu. Wykonanie tego nieinwazyjnego badania proponowane jest już we wczesnym etapie diagnostyki [4,7,9,13]. Ryc. 1

Według Kashtana [7] 2 spośród wymienionych poniżej diagnostycznych kryteriów upoważniają do rozpoznania ZA:

- wywiad rodzinny w kierunku krwinkomoczu lub przewlekłej niewydolności nerek (u co najmniej dwóch członków rodziny)
- obecność stałego krwinkomoczu
- obustronny postępujący niedosłuch neurosensoryczny
- mutacje genów COL4A3, COL4A4, COL4A5 (ewentualnie COL4A6)
- stwierdzenie niedoboru lub braku epitopu $\alpha 5$ w błonach podstawnych nerki (IV) NC1 (*niedobór lub brak epitopu $\alpha 5(IV)NC1$ stwierdzany jest u około 80% mężczyzn i 60-70% kobiet z rozpoznaniem ZA związanym z chromosomem X*)
- stwierdzenie niedoboru lub braku epitopu $\alpha 5$ w błonie podstawnej nabłonka skóry (IV) NC1 (*niedobór lub brak epitopu $\alpha 5(IV)NC1$ stwierdzany jest u około 80% mężczyzn i 60-70% kobiet z rozpoznaniem ZA związanym z chromosomem X*)
- patognomiczne zmiany w błonie podstawnej kłębuszka widoczne w mikroskopie elektronowym
- typowe zmiany w narządzie wzroku
- makrocytopenię lub ziarnistości cytoplazmatyczne w granulocytach
- lejomatozę.

Do rozpoznania ZA upoważnia obecność 4 z wymienionych kryteriów. Wyniki badań immunohistochemicznych mają decydujące znaczenie w wykryciu przypadków niepełnoobjawowych, nie spełniających nawet 4 z wymienionych kryteriów [5].

Z powodu limitowanego dostępu do badań genetycznych, badanie immunohistochemiczne biopsji skóry (a w razie konieczności biopsji nerki) jest postępowaniem cennym diagnostycznie. Mając tę samą czułość, jest tańsze i daje szybszy wynik, niż analiza molekularna [4].

W rozpoznaniu różnicowym należy uwzględnić inne dziedziczne autosomalnie i postępujące glomerulopatie, jak rodzinne ogniskowe szklwienie kłębuszków oraz stany chorobowe przebiegające z krwinkomoczem, jak nefropatia IgA, różne postaci kłębuszkowych zapaleń nerek czy stany zagrożenia kamicą.

Cel

Celem pracy było wdrożenie diagnostyki chorób kolagenu typu IV opartej na badaniu immunohistochemicznym biopsji nerki i skóry oraz analiza przydatności tego badania w wykrywaniu chorób kolagenu typu IV.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 46 pacjentów w wieku od 2 do 18 lat, u których na podstawie:

- obecności stałego krwinkomoczu (K),
- wywiadu rodzinnego w kierunku krwinkomoczu lub/ i przewlekłej niewydolności nerek (W),
- obustronnego postępującego niedosłuchu neurosensorycznego (N),
- patognomicznych zmian w błonie podstawnej kłębuszka widocznych w mikroskopie elektronowym (ME) podejrzewano zespół Alporta.

W Tabeli II przedstawiono liczbę, odsetek i płeć chorych spełniających poszczególne kryteria rozpoznania choroby.

W pierwszym etapie badania poddany był materiał z wykonanych już wcześniej biopsji nerek. Oceniono materiał z 10 biopsji - wykonując badania immunohistochemiczne z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych dla łańcuchów $\alpha 1$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$ kolagenu typu IV.

W drugim etapie (01.2010- 09.2011) w Klinice Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IP CZD wykonano 5 gruboigłowych biopsji nerki u 3 dziewczynki i 2 chłopców w wieku od 2 do 17 lat. Biopsje nerki wykonywane były wyłącznie ze wskazań medycznych i obejmowały one obok rutynowego badania patomorfologicznego badanie immunohistochemiczne za pomocą swoistych monoklonalnych przeciwciał.

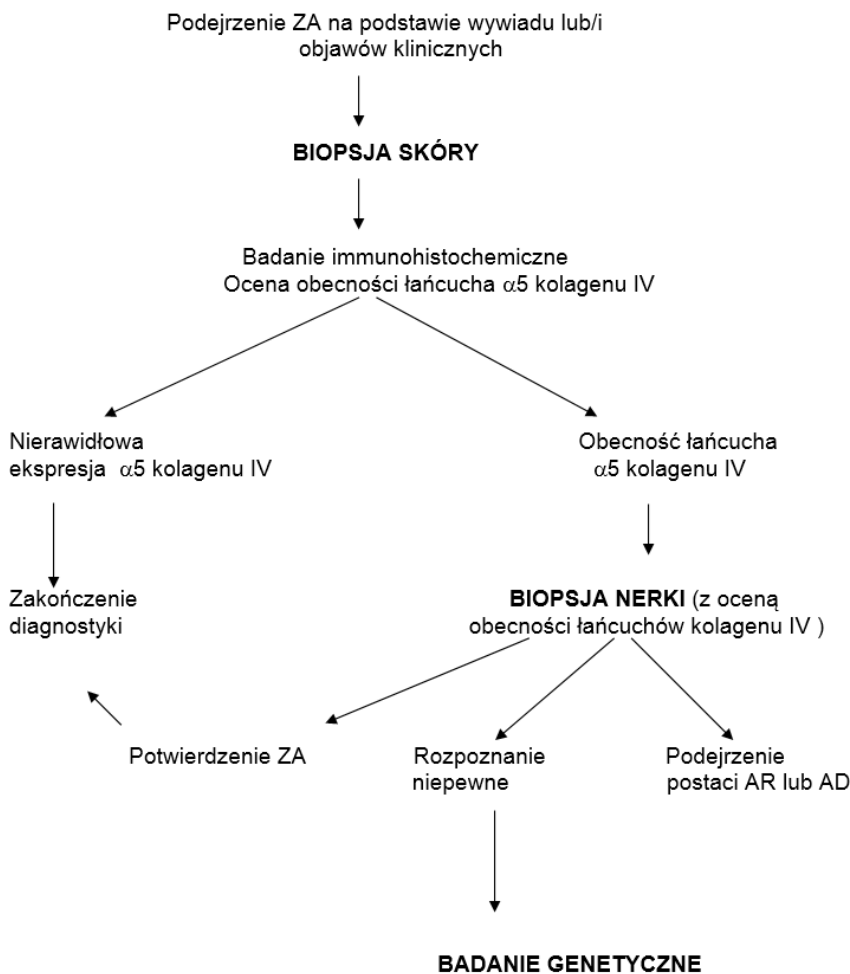
Wykonano 35 biopsji skóry u 22 dziewczynki i 13 chłopców w wieku od 5 do 18 lat. Zabieg był wykonywany w znieczuleniu miejscowym, materiał był pobierany ze skóry poślodka, sztancą \varnothing 3mm.

Łącznie wykonano 51 oznaczeń (badań immunohistochemicznych z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych) u 24 dziewczynki i 22 chłopców - 45 Zakładzie Patologii IP CZD oraz 6 w Klinice Medycyny Transplantacyjnej i Nefrologii, Instytutu Transplantologii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Oceniono materiał z 35 wykonanych biopsji skóry oraz z 16 biopsji nerek (14 biopsji nerki wykonanych w IPCZD oraz 2 wykonane w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie).

Badanie immunohistochemiczne z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych dla łańcuchów $\alpha 1$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$ kolagenu typu IV było wykonane za pomocą Wieslab® Alport's Syndrome kit (Euro-Diagnostica).

Wyniki

Rozpoznanie zespołu Alporta potwierdzono u 39 pacjentów (19 dziewczynki i 20 chłopców) – Tabela III. U 3 dziewczynki i 2 chłopców spośród w/w stwierdzono śladową ekspresję łańcucha $\alpha 5$ kolagenu typu IV w skórze oraz u 1 dziewczynki śladową ekspresję łańcuchów $\alpha 3$ i $\alpha 5$ kolagenu typu IV w błonach podstawnych cewek i kapilarów kłębuszkowych, co także jest



Rycina 1
Algorytm postępowania diagnostycznego w zespole Alporta wg CE Kasztan.
Diagnostic algorithm in Alport syndrome (by CE Kashtan).

potwierdzeniem rozpoznania ZA.

U 4 dziewczynki i 1 chłopca wykonano badanie immunohistochemiczne z zastosowaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych dla łańcuchów $\alpha 1$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$ kolagenu typu IV zarówno w biopsji skóry jak i nerki. Identyfikacja obraz dystrybucji łańcuchów w skórze i nerce stwierdzono w 4 (80%) przypadkach, natomiast w 1 przypadku stwierdzono śladową ekspresję łańcucha $\alpha 5$ kolagenu typu IV w biopsji nerki, przy braku tego łańcucha w biopsji skóry.

Prawidłową dystrybucję kolagenu typu IV stwierdzono u 20,83% badanych dziewczynki i 9,1% badanych chłopców spełniających kryteria rozpoznania ZA wg Kashtana. Prawidłowa dystrybucja kolagenu typu IV w biopsjach nerki i skóry nie zaprzecza rozpo-

znaniu choroby kolagenu typu IV [7,9].

U pacjentów spokrewnionych (6 rodzin) stwierdzono identyczną dystrybucję łańcuchów α kolagenu IV w badanych tkankach, w poszczególnych rodzinach.

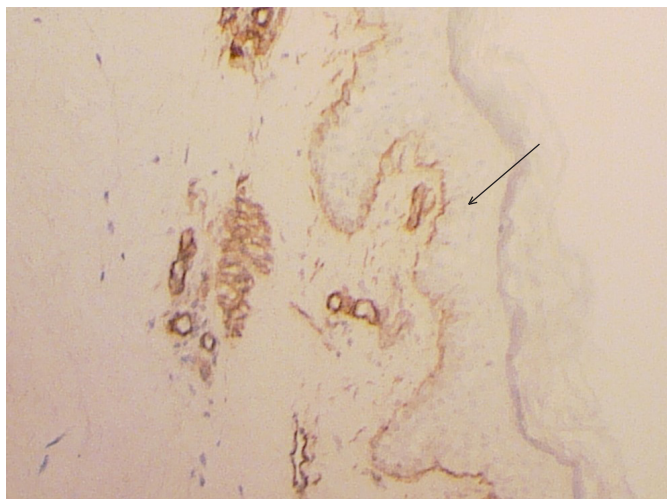
Dyskusja

Złotym standardem w rozpoznawaniu ZA jest badanie genetyczne z oznaczeniem określonych mutacji genowych w odpowiednich eksonach chromosomów X, 2 i 13 prowadzących do zaburzeń struktur kolagenu typu IV [2]. Sposób dziedziczenia związany z płcią (mutacja genu *COL4A5*) odpowiada za 85% przypadków ZA. Znalezione powyżej 600 mutacji genu *COL4A5* [13].

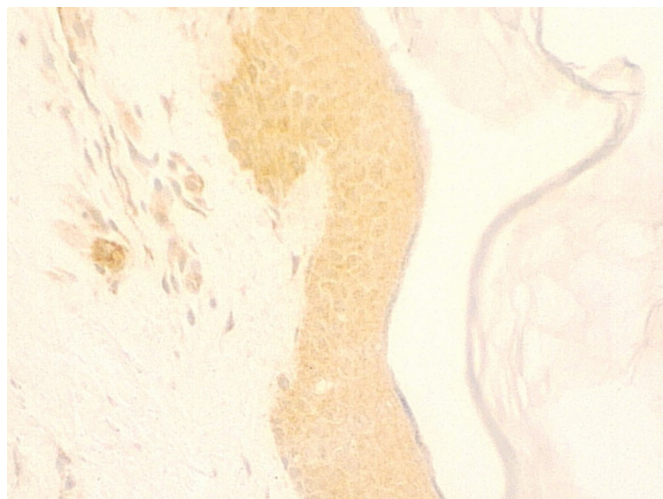
Wg Bakheirnia i wsp. [1] istnieje ścisła korelacja między rodzajem mutacji *COL4A5*

oraz manifestacją kliniczną (wiek wejścia w schyłkową niewydolność nerek, objawy kliniczne) u pacjentów płci męskiej. Jednakże ilość mutacji, związana z tym czasochłonność i koszty badań genetycznych powodują ograniczenie stosowania tego badania na szeroką skalę.

Badaniem immunohistochemicznym za pomocą swoistych przeciwciał monoklonalnych można wykryć każdy łańcuch kolagenu typu IV. Ocena biopsji skóry pozwala na rozpoznanie XLD przy dużej czułości metody (do 85%). Wykonanie tego nieinwazyjnego badania proponowane jest już we wczesnym etapie diagnostyki [4,7,9,13]. Pozwala uniknąć u pacjentów z podejrzeniem zespołu Alporta i nieznacznie nasilonymi objawami klinicznymi wykonania biopsji nerki.



Rycina 2
Prawidłowa ekspresja łańcucha 5 kolagenu IV na granicy skórno-naskórkowej.
Normal expression of collagen IV $\alpha 5$ chain at the dermal-epidermal border.



Rycina 3
Brak ekspresji łańcucha 5 kolagenu IV na granicy skórno-naskórkowej. No expression of collagen IV $\alpha 5$ chain at the dermal-epidermal border.

Tabela II

Liczba i odsetek chorych spełniających określone kryteria rozpoznawcze zespołu Alporta.
Number and percentage of patients who met specific diagnostic criteria of the Alport syndrome.

Kryteria rozpoznania	Liczba (%) chorych	Liczba chorych z podziałem na płeć
K+W	19 (41,3%)	14 dziewczynki i 5 chłopców
K+W+N	4 (8,7%)	1 dziewczynka i 3 chłopców
K+W+ME	13 (28,3%)	8 dziewczynki i 5 chłopców
K+W+N+ME	6 (13%)	6 chłopców
K+ME	4 (8,7%)	1 dziewczynka i 3 chłopców

Tabela III

Dystrybucja łańcuchów $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ kolagenu IV w tkance nerki i skórze u pacjentów z podejrzeniem zespołu Alporta (ZA).
Distribution of collagen IV $\alpha 1, 3, 5$ - chains in renal and dermal tissue in patients suspected of Alport syndrome.

Pacjenci z potwierdzeniem rozpoznania ZA	Dystrybucja łańcuchów α kolagenu IV	Nerka	Skóra
3♀ 9♂	$\alpha 1(+)$ $\alpha 3(-)$ $\alpha 5(-)$	12	23
13♀ 10♂			
1♀	$\alpha 1(+)$ $\alpha 3(-)$ $\alpha 5(+/-)$	1	5
3♀ 2♂			
1♀	$\alpha 1(+)$ $\alpha 3(-)$ $\alpha 5(+/-)$	1	1
	$\alpha 1(+)$ $\alpha 3(-)$ $\alpha 5(-)$		
Pacjenci bez potwierdzenia rozpoznania ZA	Wyniki	Nerka	Skóra
1♀ 1♂	$\alpha 1(+)$ $\alpha 3(+)$ $\alpha 5(+)$ $\alpha 1(+)$ $\alpha 3(-)$ $\alpha 5(+)$	2	6
5♀ 1♂			
Razem		16	35

Większe znaczenie diagnostyczne ma ocena biopłatu nerki. Analiza porównawcza typowej dystrybucji łańcuchów α kolagenu IV w błonach podstawnych nerki u zdrowych i chorych z chorobą kolagenu typu IV ułatwia postawienie prawidłowego rozpoznania postaci ZA. W błonie podstawnej kłębuszka, cewki dalszej i torebki Bowmana, u chłopców w postaci sprzężonej z płcią, zwykle brak ekspresji łańcuchów $\alpha 5$, ale występuje także brak lub zmniejszenie ekspresji łańcuchów $\alpha 3$ i $\alpha 4$, co jest specyficznym markerem dla ZA. W postaci recesywnej nie stwierdza się łańcuchów $\alpha 3$ i $\alpha 4$ w błonie podstawnej kłębuszka, cewki dalszej i torebki Bowmana, brak łańcucha $\alpha 5$ w błonie podstawnej kłębuszka, natomiast wyrażona jest jego ekspresja w cewce zbiorczej i torebce Bowmana [4,7,9,11].

Interpretując wyniki badań immunohistochemicznych na obecność łańcuchów kolagenu typu IV, należy pamiętać, że prawidłowa dystrybucja kolagenu typu IV w biopłatach nerki i skóry nie zaprzecza rozpoznaniu ZA [5,7,8,9]. Stwierdzana jest u 13-20% badanych, przy jednoczesnej obecności mutacji genu *COL4A5* u 95% spośród tych pacjentów. W naszym materiale prawidłową dystrybucję kolagenu typu IV stwierdzono u 20,83% badanych dziewczynek i 9,1% badanych chłopców spełniających kryteria rozpoznania ZA wg Kashtana [7]. Identyczny obraz dystrybucji łańcuchów w skórze i nerce stwierdzono w 4 (80%) przypadkach, natomiast w 1 przypadku stwierdzono śladową ekspresję łańcucha $\alpha 5$ kolagenu typu IV w biopłacie nerki, przy braku tego łańcucha w biopłacie skóry.

Podsumowując badanie immunohistochemiczne za pomocą swoistych mono-

klonalnych przeciwciał pozwalające wykryć poszczególne łańcuchy α kolagenu typu IV w błonach podstawnych nerki, a także w błonie podstawnej nabłonka skóry jest pomocne w potwierdzeniu zespołu Alporta.

Wnioski

1. Badanie immunohistochemiczne za pomocą swoistych monoklonalnych przeciwciał pozwalające wykryć poszczególne łańcuchy α kolagenu IV w błonach podstawnych nerki, a także w błonie podstawnej nabłonka skóry jest pomocne w potwierdzeniu zespołu Alporta.

2. Biopsja skóry jest prostym, nieinwazyjnym badaniem pozwalającym uniknąć u pacjentów z podejrzeniem zespołu Alporta i nieznacznie nasilonymi objawami klinicznymi wykonania biopsji nerki.

Komentarz: Badania mają charakter pilotażowy i będą kontynuowane.

Zestawy diagnostyczne *Wieslab*® Alport's Syndrome kit (Euro-Diagnostica) były zakupione w ramach zadania statutowego IPCZD nr 198/09 oraz ze środków Fundacji Towarzystwa Przyjaciół Centrum Zdrowia Dziecka.

Podziękowanie dla Zakładu Patologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie za udostępnienie materiału do badań immunohistochemicznych.

Piśmiennictwo:

1. Bekheirnia M.R., Reed B., Gregory M.C. et al.: Genotype - phenotype correlation in x-linked Alport syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010, 21, 876.
2. Grenda R., Jarmoliński T.: Wrodzone choroby kłębuszków nerkowych. Zespół Alporta. w: *Nefrologia.*

red. Książek A, Rutkowski B, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004, 528.

3. Gross O., Netzer K.O., Lambrecht R. et al.: Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome. *Nephrol. Dial. Transpl.* 2003, 18, 1122.
4. Gubler M.C.: Diagnosis of Alport syndrome without biopsy? *Pediatr. Nephrol.* 2007, 22, 621.
5. Heidet L., Gubler M.C.: The Renal Lesions of Alport Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 1210.
6. Hertz J.M.: Alport syndrome. Molecular genetic aspects. *Dan. Med. Bull.* 2009, 56, 105.
7. Kashtan C.E.: Familial hematuria. *Pediatr. Nephrol.* 2009, 24, 1951.
8. Massella L., Onetti Muda A., Faraggiana T. et al.: Epidermal basement membrane alpha 5(IV) expression in females with Alport syndrome and severity of renal disease. *Kidney Int.* 2003, 64, 1787.
9. Nakanishi K., Yoshikawa N., Iijima K. et al.: Immunohistochemical study of alpha 1-5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis. *Kidney Int.* 1994, 46, 1413.
10. Pescucci C., Longo I., Bruttini M. et al.: Type-IV collagen related diseases. *J. Nephrol.* 2003, 16, 314.
11. Reeders S.T.: Molecular genetics of hereditary nephritis. *Kidney Int.* 1992, 42, 783.
12. Vizjak A., Ferluga D.: Spectrum of collagen type IV nephropathies: from thin basement membrane nephropathy to Alport syndrome. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2008, 136 Suppl 4, 323.
13. Wang F., Zhao D., Ding J. et al.: Skin biopsy is a practical approach for the clinical diagnosis and molecular genetic analysis of X-linked Alpr's syndrome. *J. Mol. Diagn.* 2012, 8, 21.
14. Wyszyńska T.: Wrodzone i dziedziczne glomerulopatie. Nefropatie dziedziczne przebiegające z dominującym krwinkomoczem. Zespół Alporta. w: *Nefrologia dziecięca.* red. Sieniawska M, Wyszyńska T, Ośrodek Informatyki Naukowej „Polfa”, Warszawa 2003, 324.